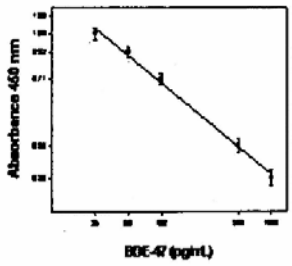
preserved buffer.

During the assay procedure, magnetic separation was performed using a magnetic separation rack (Abraxis, Warminster, PA). The device consists of a magnetic separation rack and a test tube holder, which fits over a magnetic separation rack containing permanent rare earth magnets. The two-piece design allows for up to sixty tubes to be set up, incubated and magnetically separated without removing the tubes from the tube holder.

Water samples were analyzed directly without any sample extraction or pre-concentration. After mixing 1:1 with methanol, 250 mL of the sample and anti-PBDE coupled magnetic particles (500 mL) were added to a disposable glass test tube and incubated for 20 minutes at room temperature. An aliquot of PBDE-HRP solution (250 mL) was added and the reaction was incubated for 20 minutes at room temperature. A magnetic field was applied to the magnetic solid-phase to facilitate washing and removal of unbound PBDE-HRP and to eliminate any potential interfering substances. The enzyme substrate and chromogen (peroxide/TMB) were then added (500 mL) and incubated for 20 minutes. The reaction is stopped with the addition of 2 N H_2SO_4 (500 mL) and the final color was read with analyzed using a photometer by determining the absorbance at 450 nm. The observed absorbance data were compared to a linear regression line using a log-log standard curve prepared from calibrators containing 0, 25, 50, 100, 500 and 1,000 parts per trillion (ppt) of BDE-47.

Results and Discussion



Dose Response Curve and Sensitivity. Figure 1 illustrates the mean standard curve for the BDE-47 calibrators collected over 24 assays, error bars represent one standard deviation (SD, n=24). The displacement at the 25 ppt level is significant (84% B/Bo, where B/Bo is the absorbance at 450 nm observed for a sample or standard divided by the absorbance at the zero standard). The assay sensitivity in water based on 90% B/Bo is 17 ppt.

Precision. Table 1 shows the results from a precision study in which surface and groundwater samples fortified with BDE-47 at 3 concentrations were each measured 5 times per assay and on five different days. The within and between day variation was estimated by the method of Bookbinder and Panosian[13]. Coefficients of variation below 5% were observed.

Table 1 Table 2

Precision of BDE-47 Measurements in Water BDE-47 Recovery in Water

Conc. of BDE-47 Added (ppt)	Recovery Mean (ppt)	S.D. (ppt)	%
62.5	56.4	2.9	90
125	131.5	5.3	105
250	270.6	12.8	108
500	510.4	28.3	102
Average			101.4

Control	1	2	3
Replicates	5	5	5
Days	5	5	5
n	25	25	25
Mean (ppt)	47	95	514
% CV (within assay)	3.2	2.2	2.0
% CV (between assay)	4.4	4.8	4.0

Accuracy. Known amounts of BDE-47 were added to four groundwater samples obtained from Warminster, PA. The samples included a municipal water source, a reservoir, a lake, a pond, and a creek. The accuracy (recovery) was assessed by analyzing the samples before and after the addition of BDE-47 and then subtracting the estimated concentration of PBDE before spiking. None of the samples had significant levels of PBDEs. Added amounts were accurately recovered (Table 2). An average assay recovery of 101% was obtained.

Table 3

Specificity (Cross-Reactivity)

Compound	LDD (ppb)	50% B/Bo (ppb)
BDE -47	0.017	0.135
BDE-99	0.02	0.15
BDE -28	0.045	0.9
BDE 100	0.055	5.5
BDE 153	0.075	10
BDE 154	3.5	580
BDE -183	13.5	2000
BDE -209	370	3000
Aroclor 1254	3	180
PCB-37	160	2000
PCB-77	>1000	>1000
PCP	3300	>10,000
2-4-D	>10,000	>10,000

Specificity. Table 3 summarizes the cross-reactivity data of the PBDE assay for various PBDE congeners as well as other environmental contaminants such as PCBs, PCP, and 2,4-D. The percent cross-reactivity was determined by estimating the amount of analogue required to displace 50% of the enzyme conjugate and comparing to the 50% displacement of the BDE-47 standard curve. The results showed that the antibody recognizes BDE-47 and BDE-99 equally well, the higher the brominate substitution the less cross-reactivity was observed. The antibodies have less than 0.1% cross-reactivity for Aroclor 1254.

Conclusions

This work describes the performance characteristics of a magnetic particle-based ELISA for the detection of PBDEs in groundwater samples. The assay is fast, and eliminates the need for expensive instrumentation and solvent disposal. The ELISA exhibits good precision and accuracy which can provide consistent and cost-effective monitoring of water samples. Using this ELISA, fifty results can be obtained in about one hour. Future efforts will be to extend these observations to the analysis of other type of matrices such as food, serum, milk, soil, and to perform comparison with other analytical methods.

Acknowledgements

The authors would like to thank Amy McGarvey for technical assistant.

References

1. IPCS (1994). Environmental Health Criteria 162: Brominated diphenyl ethers. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva.

2. Hardy, M.I. *Chemosphere* ***2002***, 46, 757-777.

3. deWitt, C.A. *Chemosphere* **2002**, 46, 583-624.

4. Boon, J.P.; Lewis, W.E.; Tjoen-A-Choy, M.R.; Allchin, C.B.; Law, R.J.; De Boer, J.; Hallers-Tjabbes, C.C.; Zegers, B.N.; *Environ. Sci. Technol.* ***2002***, 46, 697-707.

5. Anderson, O., and Blomkvist, G. *Chemosphere* ***1981***, 10, 1051-1060.

6. Klasson Wehler, E.; Hovander, L.; Bergman, A. *Organohalgen Compd.* **1997**, 33, 420-425.

7. Meiroyte, D.; Noren, K; Bergman, A. *J. Toxicol. Environ. Health.* ***1999***, 58, 329-341.

8. Brouwer, A.; Morse, D.C.; Lnas, M.C.; Schuur, A.G.; Murk, A.J.; Klasson-Wehler, E.; Bergman, A., and Visser, T.J. **1998**, *Toxicol. Ind. Health*, 14, 59-84.

9. Hottenstein, C.S.; Fleeker, J.R; Herzog, D.P.; Rubio, F.M.; Lawruk, T.S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ***1996***, *44:3576-358.*

10. Jourdan, S.W.; Scutellaro, A.M; Fleeker, J.R.; Herzog, D.P.; Rubio, F.M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***1995,** *43:2784-2788.*

11. Lawruk, T.S.; Gueco, A.M.; Jourdan, S.W.; Scutellaro, A.M.; Fleeker, J.R.; Herzog, D.P.; Rubio, F.M. *Journal of Wine Research* **1994,** *5:205-214.*

12. Shelver, W. L., Keum, Y. –S., Kim, H. –J., Rutherford, D., Hakk, H., Bergman, D., and Li, Q. X. *J. Agri. Food*

Chem. **2005** (web release: April 15, 2005)

13. Bookbinder, M.J.; Panosian, K.J. Correct and Incorrect Estimation of Within and Between-day Variation. *Clin. Chem.* **1986,** *32:1734-1737.*

付録３　取扱説明書

ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）ELISA キット（マグネティック・パーティクル）・使用説明書

●はじめに

本製品はポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）を分析するキットです。各種環境水（地下水、表流水、井戸水、処理水、など）を分析する場合は、別添の使用方法もご参照ください。土壌や生体試料など他のマトリクスを測定する場合はお問い合わせください。

●測定原理など

ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）ELISA キット（マグネティック・パーティクル）は酵素免疫測定法（ELISA）を原理とした PBDE 分析キットです。測定試料を抗 PBDE 抗体を固定化した磁気微粒子(マグネティック・パーティクル)溶液と試験管内で混合し、これに抗原酵素複合体溶液を加えると、試料中の PBDE と抗原酵素複合体の間で、磁気微粒子に固定化した抗体の結合部位を奪い合う競争反応が起こります。20 分間の競争反応の後、磁気で磁気微粒子を試験管壁面に吸着させた状態で、抗体に結合しなかった PBDE や抗原酵素複合体を洗浄液で洗い流します。（このとき、もともと溶液中の存在比で、PBDE と抗原酵素複合体が磁気微粒子上の抗体に結合しています。）

試料中の PBDE は酵素基質（過酸化水素）と水素供与体（3,3’,5,5’-テトラメチルベンチジン）からなる発色液（Color Solution）により検出されます。（PBDE 抗体に結合した抗原酵素複合体が発色液を着色させます。）20 分の発色反応時間の後に発色停止液（Stopping Solution）の添加により発色反応を止め、着色を安定化させます。この発色に寄与する抗原酵素複合体は、試料中の抗原（PBDE）との競争反応のすえ抗体に結合したもので、着色度は試料中の PBDE 濃度に反比例する結果となります。

●試薬

ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）ELISA キット（マグネティック・パーティクル）には以下の試薬が含まれています。

①抗 PBDE 抗体固相化磁気微粒子（PBDE Antibody Coupled Paramagnetic Particles）

抗 PBDE 抗体（ウサギ）を共有結合した磁気微粒子懸濁液（ベース：防腐剤と安定剤を含有した緩衝溶液）
100 テスト分：60mL

②抗原酵素複合体溶液（PBDE Enzyme Conjugate）

西洋ワサビペルオキシターゼ溶液（ベース：防腐剤と安定剤を含有した緩衝溶液）
100 テスト分：30mL

③PBDE 標準液（PBDE Standards）

標準液　0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0ppb PBDE(#47)メタノール溶液（ベース：防腐剤と安定剤を含有したメタノール 50%溶液）
100 テスト分：各 2mL

④コントロール（Control）

PBDE 0.25ppb 溶液（ベース：防腐剤と安定剤を含有したメタノール 50%溶液）
100 テスト分：2mL

⑤希釈液／ゼロ標準液（試料希釈液）（Diluent/Zero Standard (Sample Diluent)）

PBDE や抗体への交差反応物質を含まない防腐剤と安定剤を含有したメタノール溶液
100 テスト分：35mL

⑥発色液（Color Solution）

過酸化水素と 3,3’,5,5’-テトラメチルベンチジン溶液（ベース：有機溶剤）
100 テスト分：65mL

⑦発色停止液（Stopping Solution）

0.5%希硫酸
100 テスト分：60mL

⑧洗浄液 T（Washing Solution T）

洗浄剤を含有した蒸留水
100 テスト分：250mL

⑨試験管（Test Tubes）

ガラス製使い捨て試験管
100 テスト分：36 本入り（3 箱）

●試薬の保存と安定性

全ての試薬を 2-8℃で保存してください（冷凍厳禁）。試薬はキット箱記載の使用期限までにご使用ください。キット添付の試験管は冷蔵保存の必要がありませんから、冷蔵庫スペースを有効利用するためにも、別の場所に保存してください。

試薬の廃棄については、所定の法定規則に従ってください。

●必要な器具や試薬（キットに含まれないもの）

キットに含まれる試薬以外に、以下の器具や試薬が必要になります。

- マイクロピペット（250, 500 µL が秤量可能なもの）
- 分注ピペット（1mL が秤量可能なもの）
- ボルテックスミキサー
- マグネティクセパレーションラック（Magnetic Separation Rack）※
- 吸光度計（450nm を読み取り可能なもの）※

※詳しくはお問い合わせください。

●測定試料について

水試料については別添の取り扱い説明書をご参照ください。その他の試料についてはお問い合わせください。

モノクロロ酢酸や他の酸で保存されている試料は 6N 水酸化ナトリウム等の強塩基で中和してください。

試料中の PBDE 濃度が 1.0ppb 以上の場合は試料を希釈して再測定してください。この場合、キット添付の⑤希釈液／ゼロ標準液（試料希釈液）（Diluent/Zero Standard (Sample Diluent)）で 10 倍またはそれ以上の希釈を推奨します。（例えば、別の試験管に 900µL の希釈液を取り、そこに 100µL の試料を添加し完全に混合してください。測定方法に従い測定し、得られた結果を希釈倍率で掛け戻してください。）

以下の物質が1%以上試料中に混在しても、測定結果に影響を与えません。

窒素、リン、硫黄、フッ素、カリウム、マグネシウム、銅、亜鉛、鉄、ナトリウム

フミン酸および硫酸鉄は 100ppm まで影響を受けません。

●試薬の調製

全ての試薬を使用前に室温にもどしてください。①抗 PBDE 体抗固相化磁気微粒子（PBDE Antibody Coupled Paramagnetic Particles）は使用前に完全に混合してください。

●ご使用に関する注意等

他のイムノアッセイ同様、首尾一貫したピペット操作が満足な測定結果を得るための鍵となります。測定精度を最も高めるために、どの試験管に対しても全く同じ操作を行ってください。

試薬とピペットチップが接触しないことに注意しながら、試薬類はウェルや試験管の底に直接添加してください。

試薬相互のコンタミや直前に使用した試薬の混入を防ぐため、各試料の添加にはそれぞれ新しいピペットチップを使用し、先に入れた試薬とピペットチップが接触しなよう注意してください。

ボルテックスミキサーでの攪拌時に気泡が生じないように注意してください。

マグネティクセパレーションラック（Magnetic Separation Rack）は 2 つのパーツから構成されています。上部は試験管を保持するためのパーツで、下部は強力磁石を内包しており抗体を固定化した磁気微粒子を引き付ける役割を果たします。各反応工程では、上部パーツを下部から引き離してください。そうすることで、反応中溶液中の磁気微粒子を均一に保つことができます。洗浄工程では上部と下部のパーツを重ね合わせ、磁気微粒子を試験管壁面に吸着させます。（下部パーツを使用するのは、洗浄時のみです。）

測定精度を高めるため、洗浄工程には十分に注意を払い、常に同じリズムで行ってください。セパレーションラックを作業者から遠い位置に持ち、ゆっくりと反転させてデカント（上澄み液の分離=廃棄）を行ってください。このとき巧みに動作を反転させることにより、試験管の一方のみを伝って液体が流出するようにすれば効果的です。ラックを反転させた状態で試験管先をウエス等に接触させ、試験管先の液滴を取ることができます。このとき、ラックをウエス等から離し、また押し付ける動作を数回繰り返すことにより、より効果的に

のキットには濃度既知 (0.25ppb) のコントロールが添付されています。測定時にコントロールも加え、測定値のずれを精度管理に利用することができます。

●使用方法

試薬の調製やご使用に関する注意等をよくお読みください。

1. 環境水試料については、別添の水試料に関する取り扱い説明書をご参照ください。水以外のマトリクスについては、お問い合わせください。
2. キット添付のガラス試験管に標準液、コントロール、サンプル名を印字してください。

<一例>

試験管 No.	添加試薬や試料
1,2	希釈液/ゼロ標準液, 0 ppb
3,4	標準 1, 0.025 ppb
5,6	標準 2, 0.05 ppb
7,8	標準 3, 0.1 ppb
9,10	標準 4, 0.5 ppb
11,12	標準 5, 1.0 ppb
13	コントロール
14	試料 1
15	試料 2
16	試料 3

3. 250 uL の③PBDE 標準液 (PBDE Standards)、④コントロール (Control)、試料を 2.で印字した試験管に入れてください。
4. ①抗 PBDE 体抗固相化磁気微粒子 (PBDE Antibody Coupled Paramagnetic Particles) を攪拌して完全に均一化してから、500 uL を各試験管に入れてください。
5. 泡立に注意しながらボルテックスミキサーで 1～2 秒攪拌してください。
6. 室温で 20 分間放置して抗原抗体反応を行ってください。
7. 250 uL の②抗原酵素複合体溶液 (PBDE Enzyme Conjugate) を各試験管に入れてください。
8. 泡立に注意しながらボルテックスミキサーで 1～2 秒攪拌してください。
9. 室温で 20 分間放置して競争反応を行ってください。
0. マグネティクセパレーションラックの両パーツをセットして、2 分間放置して固液分離を行ってください。
1. 一定の動作でセパレーションラックを反転させ、デカント (上澄み液の分離=廃棄) を行ってください。
2. 1mL の⑧洗浄液 T (Washing Solution T) を各試験管に加え、ボルテックスミキサーで 1～2 秒攪拌してください。セパレーションラックの両パーツをセットして、2 分間放置して (固液分離を) 行ってください。
3. 一定の動作でセパレーションラックを反転させ、デカント (上澄み液の分離=廃棄) を行ってください。
4. 12.と 13.のステップを再度実施してください。
5. セパレーションラックの上部 (試験管保持部分) を外し、500 uL の⑥発色液 (Color Solution) を各試験管に加えてください。
16. 泡立に注意しながらボルテックスミキサーで 1～2 秒攪拌してください。
17. 室温で 20 分間放置して発色反応を行ってください。
18. 500µL の⑦発色停止液 (Stopping Solution) を各試験管に加えてください。
19. 新しい試験管に 1mL の⑧洗浄液 T (Washing Solution T) を入れ、ステップ 20.のブランク (リファレンス) に使用してください。
20. 発色停止液を入れてから 15 分以内に吸光度 (450 nm) を測定してください

●測定結果の算出方法

手計算

1. 各標準液の吸光度の平均値を計算してください。
2. ゼロ標準の平均吸光度で各平均吸光度を割った値 (B/B_0) を計算してください。
3. キット添付の片対数グラフに B/B_0 (Y 軸：リニア) と各標準液濃度 (x 軸：対数) をプロットし、検量線を作成してください。
4. コントロールと試料の B/B_0 を検量線に参照して各濃度を読み取ってください。

●性能試験データ (Abraxis 社実施例)

感度

ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) ELISA キット (マグネティック・パーティクル) の検出下限は 0.017ppb です (B/B_0=90%で算出)。

特異性 (交差反応性)

ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) ELISA キット (マグネティック・パーティクル) の関連物質に対する交差反応性は以下の通りです。(B/B_0=90%から算出した検出下限および阻害率 50%となるのに必要な濃度の 2 通りで表現しています。)

化合物	LDD 50% B/Bo Compound (ppb)	(ppb)
PBDE Congener 47	0.017	0.135
PBDE Congener 99	0.02	0.15
PBDE Congener 28	0.045	0.9
PBDE Congener 100	0.055	5.5
PBDE Congener 153	0.075	10
PBDE Congener 154	3.5	580
PBDE Congener 183	13.5	2000
PBDE Congener 209	*370*	*3000*
2,2',4,5' Tetrabromobiphenyl	*6.6*	*250*
2,2',4,4',5,5' Hexabromobiphenyl	*130*	*>1000*
2,4',5 Tribromobiphenyl	*160*	*2600*
2,2',5 Tribromobiphenyl	*175*	*2900*
2,4,5 Tribromobiphenyl	*240*	*3200*
2,2',4,5',6 Pentabromobiphenyl	*320*	*>1000*
3,3',4,4',5,5' Hexabromobiphenyl	*>1000*	*>1000*
2,2'4,4'6,6' Hexabromobiphenyl	*>1000*	*>1000*
Decabromobiphenyl	*>1000*	*>1000*
PCB Aroclor 1254	*3*	*180*
PCB Congener 37	*160*	*2000*
PCB Congener 77	*>1000*	*>1000*
2,2',4,4' Tetrachlorobiphenyl	*16*	*360*
2,2',4,4',5 Pentachlorobiphenyl	*54*	*1500*
PCP	*3300*	*>10,000*
2-4-D	*>10,000*	*>10,000*

以下の化合物が試料中に 10,000ppb 存在しても本 ELISA キットに反応しないことを確認しています。

ビフェニル、2,5-ジクロロフェノール、2,3,5-トリクロロフェノール、ジ-n-オクチルフタレート

●お問合せ

日本エンバイロケミカルズ㈱ 事業開発室
〒105-0023
東京都港区芝浦一丁目 2 番 1 号 シーバンス N 館 9F
TEL: 03-5444-9891 FAX: 03-5444-9860
E-mail: eco@jechem.co.jp
URL: http://www.jechem.co.jp

水試料中の PBDE 分析

●用途

各種の水検体（地下水、表流水、井戸水、排水）中のポリ臭化エーテル（PBDEs）の測定

●必要な器具や試薬（キットに含まれないもの）

メタノール（HPLC 用または同等品）

●サンプルの取り扱いについて

サンプルはガラス製容器（フタの内側がテフロン加工されているもの）に捕集してください。採取後速やかにメタノール（HPLC 用）で1：1に希釈し、ガラスへの吸着を防いでください。

希釈後も ss 分を含む試料はろ過し、大粒子を除去してください（ろ材の一例；0.2 um Anotop™ 25 Plus, Whatman, Inc.）。

●測定にあたっての注意事項

水試料を上記の通り準備してください。測定は PBDE キットに同封されている使用説明書に従ってください。

イムノアッセイでは一定した測定手技が求められます。測定精度を確保するためにチューブ一本一本をできるだけ同じ操作・要領で取り扱ってください。

ピペットの先端が他の試薬に触れないよう注意しながら、試験管の底に直接添加してください。

試薬相互のコンタミや直前に使用した試薬の混入を防ぐため、各試料の添加にはそれぞれ新しいピペットチップを使用し、先に入れた試薬の液滴がピペットの先端に接触しないよう注意してください。

●測定データの取り扱い

手計算

1. **各標準液の吸光度の平均値を計算してください。**
2. **ゼロ標準の平均吸光度で各平均吸光度を割った値（B/B_0）を計算してください。**
3. **キット添付の片対数グラフに B/B_0（Y 軸：リニア）と各標準液濃度（x 軸：対数）をプロットし、検量線を作成してください。**
4. **コントロールと試料の B/B_0 を検量線に参照して PBDE の濃度を読み取ってください。**

吸光分析装置

検量線を自動的に作成しデータを保存できる吸光分析装置が各社から販売されています。詳細は測定装置に付属のマニュアルを参照してください。データの換算機能がある機器で PBDE を定量する場合には下記のパラメータの設定を推奨します。

メタノールで 1:1 に希釈した実サンプルあるいはコントロールでは測定濃度値を 2 倍してください。あるいは希釈倍率を自動的に補正できる分析装置の場合には下記の通り設定してください。

Data Reduct	:	Lin. Regression
Xformation	:	Ln / Ln
Read Mode	:	Absorbance
Wavelength	:	450 nm
Units	:	PPT
# Rgt Blk	:	0
Calibrators:		
# of Cals	:	6
# of Reps	:	2

Concentrations:

#1:	0.00 PPT
#2:	25 PPT
#3:	50 PPT
#4:	100 PPT
#5:	500 PPT
#6:	1000 PPT

Range	:	20 - 1000
Correlation	:	0.990
Rep. %CV	:	10%

●性能試験データ（Abraxis 社実施例）

感度

B/B_0 90%として規定した検出下限は 17ppt（0.017ppb）です。

添加回収

水道原水、上水、井戸水、湖沼水の 4 サンプルに数段階濃度の PBDE をスパイクし、メタノールで 1:1 に希釈して測定した添加回収実験の結果は以下の通りです

Amount of PBDE Added (ppt)	Recovery Mean (ppt)	S.D. (ppt)	%
62.5	56.4	2.87	90.2
125	131.5	5.30	105.2
250	270.6	12.80	108.3
500	510.4	28.32	102.1
Average			101.4

精度

下記の結果が得られています。

Control		1	2	3
Replicates	25	5	5	5
Days		5	5	5
n		25	25	25
Mean (ppb)		0.047	0.095	0.514
% CV (アッセイ内)		3.16	2.17	1.98
% CV (アッセイ間)		4.35	4.78	3.97

●お問合せ

日本エンバイロケミカルズ㈱ 事業開発室
〒105-0023
東京都港区芝浦一丁目 2 番 1 号 シーバンス N 館 9F
TEL: 03-5444-9891 FAX: 03-5444-9860
E-mail: eco@jechem.co.jp
URL: http://www.jechem.co.jp